

ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* の ゲノム解析の現状

岐阜大学生命科学総合実験センターゲノム研究分野 須賀晴久

はじめに

ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* はコムギ、オオムギ、トウモロコシなどに病害を起し、また、マイコトキシンを産生することで大きな問題となっている糸状菌である。一般に糸状菌のゲノムは数千万塩基対(数十 Mbp)で、ウイルス(数千~数十万塩基)や細菌(数百万塩基対~一千万塩基対)に比べて大きい。そのため微生物のゲノム研究が特定領域の解析からゲノム全体の解析へと広がりを見せる中、糸状菌におけるゲノム研究は全体的に遅れをとってきた。しかし、糸状菌ゲノムより大きな約 30 億塩基対に及ぶヒトゲノムの全塩基配列の解明が証明しているように、自動 DNA シーケンサーやデータ解析技術の発達は糸状菌サイズのゲノムでも全塩基配列の解明を既に可能なものにしてきている。実際、アカパンカビ *Neurospora crassa* (約 38 Mbp) をはじめ、麹菌 *Aspergillus nidulans* (約 30 Mbp)、ウシグソヒトヨタケ *Coprinus cinereus* (約 36 Mbp) など、植物病原菌ではイネいもち病菌 *Magnaporthe grisea* (約 38 Mbp)、トウモロコシ黒穂病菌 *Ustilago maydis* (約 20 Mbp) でゲノムの全塩基配列が解明されている(ただし、ここでカッコ内に示した数字は実際に決定された塩基数であって、ゲノムのほぼ全体といえるが、厳密な意味でゲノム全体ではない。一般的な方法でわずかに残された領域の塩基配列を完全に決定することは困難とされている。本稿ではこのようなものでも便宜上ゲノムの全塩基配列とする。<http://www.broad.mit.edu/annotation/>)。現在のところゲノムの全塩基配列が明らかにされた糸状菌はまだ少ないが、今後その数は増えていくものと考えられる。*F. graminearum* は 4 本の染色体、全体で約 36 Mbp のゲノムを持っており、昨年その全塩基配列が解明された(先の [http](http://fungi.fusarium/index.html) に続けて [fungi/fusarium/index.html](http://fungi.fusarium/index.html))。明らかにされた全塩基配列には 11,640 個の遺伝子が見いだされている。本稿では *F. graminearum* の交配、遺伝的多様性、マイコトキシン産生および病原性に関し、これ

までのゲノム研究の成果を概説するとともに、ゲノムの全塩基配列の解明によって可能になった新たな分子生物学的研究方法を紹介する。

I 交配

F. graminearum (有性世代: *Gibberella zeae*) は一般にホモタリク菌(同株性)、つまり 1 胞子から出た菌糸同士で交配が起こる菌としてよく知られている。近年 *G. zeae* が属している子のう菌では、ヘテロタリク菌(異株性)の研究を通じて交配型遺伝子 MAT-1 と MAT-2 が明らかにされた(有江, 2000)。一般にヘテロタリク菌では、MAT-1 をもつ株と MAT-2 をもつ株の間で交配が成立する。*F. graminearum* の場合、MAT-1 と MAT-2 の両方がゲノム中に確認されており、それによってホモタリクになっているものと考えられている(Yun et al., 2000)。ただし、ここで注意しなければならないのが、ホモタリク菌ならば異株間の交配が成立しないのかという問題である。最近の報告によれば *F. graminearum* の場合、異株間でも交配は成立している(Bowden and Leslie, 1999)。したがって、*F. graminearum* の交配では同株間および異株間の両方を考慮しなければならない。同株間の交配では理論上、遺伝的多様性が生み出されないことから *F. graminearum* では異株間の交配で遺伝的多様性が生み出されていると考えられる。しかし、交配以外の方法でも遺伝的多様性が生み出されている可能性がある。*Fusarium poae* のように *Fusarium* 菌の中には、生活環に交配が認められない、つまりすべてがクローン増殖と考えられるにもかかわらず、遺伝的多様性が非常に高いものがある(Gale, 2003)。交配以外で遺伝的多様性を産み出す機構としてトランスポゾンの移動などが考えられてはいるものの、その機構に関しては現在のところほとんど明らかにされていない。

II 遺伝的多様性

世界各地で分離された *F. graminearum* を用いて六つの遺伝子(translation elongation factor, β -tubulin, UTP-ammonia ligase, 3-O-acetyltransferase, phosphate permase および putative reductase の全 7,120 bp)

Current Studies on Genome of *Fusarium graminearum*. By Haruhisa Suga

(キーワード: 交配, 遺伝的多様性, トリコテセン系マイコトキシン産生遺伝子, 病原性関連遺伝子)

による総合的な系統解析が行われた。その結果、形態学的に一つの種とされる *F. graminearum* は少なくとも、地理的、遺伝学的に異なる九つの系統で構成されていることが判明した (O'DONNELL et al., 2000; O'DONNELL et al., 2003)。これまで日本のオオムギから分離された2株およびネパールのトウモロコシから分離された2株はいずれも第6系統であることが報告されている (O'DONNELL et al., 2000)。また、中国北部で分離された2株は第7系統であったのに対し、中国東部、浙江省のコムギから分離された225株はすべて第6系統であった (GALE et al., 2002)。韓国、江原道のトウモロコシから分離された約600株の調査では第7系統が74%と最も高く、続いて第3系統 (13%)、第6系統 (12%)、第2系統 (1%) となっていた (JEON et al., 2003)。一方、米国各地で分離された708株はすべて第7系統 (GALE et al., 2003)、メキシコで分離された215株はすべて第3系統であった (ZELLER et al., 2003)。日本ではこれまで多くの株を用いた研究例がなく、いまのところ第6系統以外の存在や遺伝的多様性はほとんどわかっていない。一般に *F. graminearum* の病原力は分離株ごとに異なることが知られている。また、海外においては、限られた地域から分離された *F. graminearum* であっても、遺伝的多様性が高いことが多くの菌糸和合群の存在によって示されてきた。BOWDEN and LESLIE (1994) は米国カンザス州の0.25 m²内の10本のコムギ穂から分離した26株を調べ、19の菌糸和合群が存在したことおよび、10本中9本の穂に菌糸和合群を異にする株が存在したことを報告している。また、韓国で分離された12株はすべて異なる菌糸和合群であったことが報告されている (MOON et al., 1999)。筆者らは日本における *F. graminearum* の遺伝的多様性と菌の動態解明を目的として単純繰り返し配列DNAマーカー (SSRs) の開発を行ってきた。SSRsは AFLP や RFLP などと比べ、簡便かつ正確なデータの入手が可能なことから生態の研究では理想的なDNAマーカーとされている。しかし、一般にその開発には費用と手間がかかる (津村, 2001)。そこで筆者らは、今回解明された *F. graminearum* のゲノムの全塩基配列を利用して効率的なSSRsの開発を試みた。その結果、日本産 *F. graminearum* の解析に適した10個のSSRsの開発に成功した。そして、それらのSSRsを用い、西日本18府県で分離された28株 (うち熊本県で分離された11株を含む) を調べたところ、これらすべての株が遺伝的に異なるものとして識別された (須賀ら, 2004)。今後、開発したSSRsを利用して日本における地域分集団の存在やその動態の解明を行っていく予定である。

表-1 トリコテセン系マイコトキシン合成関連遺伝子

遺伝子 ^{a)}	推定されている機能
<i>Tri8</i>	C-3 エステラーゼ
<i>Tri7</i>	4-O-アセチル基転移酵素
<i>Tri3</i>	15-O-アセチル基転移酵素
<i>Tri4</i>	C-2 1原子酸素添加酵素
<i>Tri6</i>	制御因子
<i>Tri5</i>	トリコジェン合成酵素
<i>Tri10</i>	制御因子
<i>Tri9</i>	機能未知
<i>Tri11</i>	C-15 1原子酸素添加酵素
<i>Tri12</i>	運搬体
<i>Tri13</i>	C-4 1原子酸素添加酵素
<i>Tri14</i>	機能未知
<i>Tri101</i>	アセチル基転移酵素
<i>Tri1</i>	C-8 1原子酸素添加酵素
<i>Tri16</i>	C-8 エステラーゼ
<i>Tri15</i>	抑制型制御因子

^{a)} 遺伝子すべてが機能しているとは限らない。

III トリコテセン系マイコトキシン産生遺伝子

トリコテセン系マイコトキシンの生合成に関しては *Fusarium sporotrichioides* で精力的に研究が進められてきた。*F. graminearum* においては *F. sporotrichioides* のトリコテセン生合成遺伝子クラスターに対応するゲノム領域がクローニングされ、その塩基配列が調べられた。その結果、*F. graminearum* のトリコテセン生合成遺伝子クラスターは *F. sporotrichioides* のものとはほぼ同じであることが明らかとなった (BROWN et al., 2001)。そこにはトリコテセン生合成過程の各段階に関わる酵素の遺伝子が七つ、制御因子の遺伝子が二つ、運搬体の遺伝子が一つおよび機能未知の遺伝子が二つ見いだされた (表-1)。また、これまでクラスター外にもトリコテセン生合成に関与する遺伝子として *Tri101*, *Tri1*, *Tri16* (*F. sporotrichioides* では正常に機能するのに対し、*F. graminearum* では機能しないことが deoxynivalenol 産生株で示されている) および *Tri15* が見いだされている (KIMURA et al., 1998; BROWN et al., 2003; ALEXANDER et al., 2003, 表-1)。一方、*F. graminearum* が産生するトリコテセンにはいくつかの種類が存在し、その種類は株によって異なることが知られている。そこで、*F. graminearum* の株は産生するトリコテセンの種類に基づいてトリコテセンケモタイプに分けられている。例えば、前述した米国の708株は94.6%が15-acetyl deoxynivalenol タイプ、5%が3-acetyl deoxynivalenol タイプ、0.4%がnivalenol タイプであった (GALE et al., 2003)。トリコテセン生合成遺伝子クラスターの両端に存在する複数の遺

伝子の系統解析では 15-acetyl deoxynivalenol および 3-acetyl deoxynivalenol, nivalenol タイプがそれぞれ単系統になる (つまりそれらのゲノム領域はケモタイプ特異的である) のに対し, 他の領域の系統解析ではそれらのケモタイプは単系統にならないことが明らかにされている (WARD et al., 2002)。また, nivalenol タイプと deoxynivalenol タイプの違いが *Tri13* の異常に起因する (正常な場合が nivalenol タイプ, 異常により機能しない場合が deoxynivalenol タイプ) ことが証明されている (BROWN et al., 2001; LEE et al., 2001; LEE et al., 2002)。これまでに明らかになったトリコテセン生合成遺伝子の多様性を利用することで PCR によるケモタイプ判定法が開発されてきた (O'DONNELL et al., 2003; LEE et al., 2001; KIM et al., 2003)。筆者らが西日本で分離された 28 株 (II で述べたのと同じ株) のケモタイプを PCR で調べてみたところでは, 3-acetyl deoxynivalenol タイプと nivalenol タイプがあったが, 15-acetyl deoxynivalenol タイプはなかった。

IV 病原性関連遺伝子

これまで標的遺伝子破壊法と restriction enzyme-mediated DNA integration 変異法を利用してトリコテセン系マイコトキシンの産生に必要な *Tri5* (ただし植物による), 情報伝達系にかかわる分子の mitogen activated protein kinase (MAP kinase) および脂質合成に必要とされる hydroxymethyl CoA reductase の遺伝子が *F. graminearum* の病原性に関与することが証明されてきた (DESJARDINS et al., 1996; Hou et al., 2002; JENCZMIONKA et al., 2003; SEONG et al., 2003)。しかしながら, これらの方法は病原性にかかわる遺伝子を明らかにすることはできても, その遺伝子が最終的に現れてくる病徴とどのようにかかわっているのかは明らかにできない。また, これらの方法でこれまで明らかにされてきた遺伝子は病原性関連遺伝子のごく一部にすぎないと考えられる。病原性の分子機構の全容を解明するためには, 多くの分子情報を迅速かつ簡便に得ることができる方法が必要である。*F. graminearum* ではゲノム全塩基配列の解明に先だって Expressed Sequence Tags (EST) 解析により mRNA が包括的に調べられ, 感染特異的に発現していると予想される 16 個の遺伝子が見いだされた (KRUGER, 2002)。しかし, EST 解析には多大な費用と手間がかかるため, 今後はより効率的に遺伝子の発現をモニタリングする技術が求められている。また, 病原性が低下している各種変異体を解析するために, 効率的に遺伝子破壊株を作成する技術が求められている。*F. graminearum* の全塩基

配列の解明はこれらの両方にとって役立つものである。全塩基配列の情報は, PCR による目的ゲノム領域の入手を可能にすることで遺伝子破壊株の作成に必要なベクター構築を簡素化することができる。また, 明らかになった 11,640 個の遺伝子情報は, トランスクリプトーム (mRNA の総体) をモニターするためのマイクロアレイ (DNA チップ) やプロテオーム (タンパク質の総体) をモニターするための遺伝子情報を載せた二次元ゲル電気泳動像の開発に欠かすことができないものである。今後これらのモニター技術によって野生株と各種病原性低下変異体の感染過程における遺伝子の発現を包括的に比較することが可能になるであろう。一方, *F. graminearum* 以外の糸状菌で蓄積しつつある分子情報も重要となっている。各種植物病原性糸状菌では MAP kinase の病原性への関与が共通に報告されている (XU and HAMER, 1996; LEV et al., 1999; TAKANO et al., 2000)。また, 病原菌間や病原菌と非病原菌間のゲノム比較によって今後 *F. graminearum* の病原性機構の解明において有益な情報が得られる可能性がある (YODER and TURGEON, 2001)。

おわりに

ゲノムの全塩基配列の解明は, よく生命の設計図を読んだことになぞらえる。しかし, その設計図に書き込まれている遺伝子は何をしているのか予想すらできないものも多い。一般に一つの遺伝子でもその機能は単純ではなく, それらが複合的に働いて各種生命現象が起きている。さらに, 病害の発生においては *F. graminearum* だけでなく環境と宿主が大きくかかわってくる。*F. graminearum* の設計図は, 一応読まれた。そこには *F. graminearum* の進化や生命現象に関する膨大な情報が埋め込まれているはずである。今後 *F. graminearum* を制御するうえで, また他の植物病原性糸状菌の制御にヒントを与えるうえで, この設計図の理解を深めていくことが必要と考えられる。そのためには *F. graminearum* とそれを取りまく環境, 宿主の総合的研究の中で様々な角度からこの設計図を解析していくことが重要であろう。

謝辞 日本産 *F. graminearum* の生態学的研究において中島隆氏をはじめとする九州沖縄農研センターの皆様, また, 本稿の執筆に当たっては岐阜大学の百町満朗氏, 景山幸二氏にご協力いただいた。記してお礼申し上げます。

引用文献

- 1) ALEXANDER, N. J. et al. (2004) : *Curr. Genet.* 45: 157 ~ 162.
- 2) 有江 力 (2000) : *日本農薬学会誌* 25: 44 ~ 50.
- 3) BOWDEN, R. L. and J. F. LESLIE (1994) : *Phytopathology* 84: 1140 (Abstract).

- 4) ——— (1999) : *ibid.* 89 : 182 ~ 188.
 5) BROWN, D. W. et al. (2001) : *Fungal Genet. Biol.* 32 : 121 ~ 133.
 6) ——— (2003) : *J. Agric. Food Chem.* 51 : 7936 ~ 7944.
 7) DESJARDINS, A. E. et al. (1996) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9 : 775 ~ 781.
 8) GALE, L. R. et al. (2002) : *Phytopathology* 92 : 1315 ~ 1322.
 9) ——— (2003) : *Population Biology of Fusarium Species Causing Head Blight of Grain Crops* (LEONARD, K. J. and W. R. BUSHNELL Ed.), *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley, The American Phytopathological Society Press* : p.120 ~ 143.
 10) ——— et al. (2003) : 2003 National Fusarium Head Blight Proceedings : p.139.
 11) HOU, Z. et al. (2002) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 1119 ~ 1127.
 12) JENCZMONKA, N. J. et al. (2003) : *Curr. Genet.* 43 : 87 ~ 95.
 13) JEON, J. -J. et al. (2003) : *Fungal Genetics Newsletter 50 Supplement (XXII Fungal Genetics Conference Abstract)* : p.142.
 14) KIM, H. S. et al. (2003) : *Mycol. Res.* 107 : 190 ~ 197.
 15) KIMURA, M. et al. (1998) : *FEBS Lett.* 435 : 163 ~ 168.
 16) KRUGER, W. M. et al. (2002) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 445 ~ 455.
 17) LEE, T. et al. (2001) : *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 2966 ~ 2972.
 18) ——— et al. (2002) : *ibid.* 68 : 2148 ~ 2154.
 19) LEV, S. et al. (1999) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 13542 ~ 13547.
 20) MOON, J. H. et al. (1999) : *Plant. Path. J.* 15 : 53 ~ 56.
 21) O'DONNELL, K. et al. (2000) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 7905 ~ 7910.
 22) ——— et al. (2003) : 2003 National Fusarium Head Blight Proceedings : 149.
 23) SEONG, K. et al. (2003) : *ibid.* : 177.
 24) 須賀晴久ら (2004) : 日植病報 : 印刷中 (講要).
 25) TAKANO, Y. et al. (2000) : *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13 : 374 ~ 383.
 26) 津村義彦 (2001) : 遺伝子多様性研究ガイド (種生物学会編) 森の分子生態学, 文一総合出版, 東京, p.158 ~ 169.
 27) WARD, T. J. et al. (2002) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 9278 ~ 9283.
 28) XU, J. -R. and J. E. HAMER (1996) : *Genes. Dev.* 10 : 2696 ~ 2706.
 29) YODER, O. C. and B. G. TURGEON (2001) : *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 : 315 ~ 321.
 30) YUN, S. -H. et al. (2000) : *Fungal Genet. Biol.* 31 : 7 ~ 20.
 31) ZELLER, K. A. et al. (2003) : 2003 National Fusarium Head Blight Proceedings : 185.

人事消息 (4月1日付)

農林水産省本省へ

東野 昭浩氏 (農産安全管理課付) は, 農産安全管理課課長補佐 (農薬企画班担当) へ
 小倉 一雄氏 (農産安全管理課生産安全専門官) は, 同上課課長補佐 (農薬検査班担当) へ
 小峯 喜美夫氏 ((独)農薬検査所調査役) は, 同上課生産安全専門官へ
 佐藤 勝也氏 ((独)農薬検査所企画評価室総括係長) は, 同上課農薬企画班農薬国際調整係長へ
 猪平 倫文氏 (横浜植物防疫所業務部) は, 同上課農薬指導班生産係長へ
 安藤 由紀子氏 (農産安全管理課課長補佐班担当) は, 植物防疫課課長補佐 (防除班担当) へ
 中森 茂氏 (名古屋植物防疫所伏木支所) は, 同上課防除班防除技術係長へ
 田中 安彦氏 (神戸植物防疫所関西空港支所次席同定官) は, 同上課課長補佐 (農業航空班担当) へ
 村井 寛氏 (生産局果樹花き課果実流通班流通第2係長) は, 同上課農業航空班指導係長へ
 金田 昌士氏 (植物防疫課課長補佐) は, 同上課課長補佐 (検査業務班担当) へ
 杉本 俊一郎氏 (横浜植物防疫所業務部次席同定官) は, 同上課課長補佐 (検査指導班担当) へ
 加藤 豊氏 ((独)農薬検査所総務課人事管理係長) は, 同上課庶務班場所庶務係長へ
 片野 恭嗣氏 (横浜植物防疫所東京支所) は, 同上課検査調整班輸入検査係長へ
 安田 修三氏 (植物防疫課課長補佐) は, 生産局農産振興課課長補佐 (鳥獣害対策班担当) へ
 新莊 裕之氏 (植物防疫課鳥獣害対策班鳥獣害対策技術係長) は, 同上局同上課鳥獣害対策班鳥獣害対策技術係長へ
 横山 秀樹氏 (神戸植物防疫所業務部) は, 同上局同上課鳥獣害対策班鳥獣害対策企画係長へ

六本木 勝氏 (植物防疫課庶務班場所庶務係長) は, 大臣官房国際部国際政策課庶務班經理係長へ
 渡邊 洋一郎氏 ((独)農薬検査所検査部長) は, 農産安全管理課付へ (退職)

植物防疫所へ

堀内 義久氏 (横浜・成田支所次長) は, 横浜・新潟支所所長へ
 山口 秀雄氏 ((独)農薬検査所総務課長) は, 横浜・総務部会計課長へ
 佐々木 武氏 (横浜・業務部次席植物検疫官) は, 横浜・業務部統括植物検疫官 (輸出及び国内検疫担当) へ
 山本 孝晴氏 (横浜・成田支所統括植物検疫官) は, 横浜・札幌支所次長へ
 莊司 宏明氏 (横浜・東京支所次長) は, 横浜・成田支所次長へ
 中野 睦男氏 (神戸・関西空港支所次長) は, 横浜・東京支所次長へ
 後藤 文男氏 (横浜・新潟支所酒田出張所所長) は, 横浜・成田支所統括植物検疫官 (第1PTB 旅客担当) へ
 村岡 力氏 (横浜・東京支所鹿島出張所所長) は, 横浜・川崎出張所所長へ
 早瀬 猛氏 (横浜・札幌支所次席同定官) は, 横浜・札幌支所釧路出張所所長へ
 小西 富夫氏 (横浜・札幌支所函館出張所所長) は, 横浜・札幌支所室蘭・苫小牧出張所所長へ
 根津 篤志氏 (横浜・成田支所次席植物検疫官) は, 横浜・札幌支所函館出張所所長へ
 佐藤 宏昭氏 (横浜・成田支所次席植物検疫官) は, 横浜・塩釜支所八戸出張所所長へ
 伊藤 喜美男氏 (横浜・川崎出張所所長) は, 横浜・塩釜支所石巻出張所所長へ
 齋 晋次郎氏 (名古屋・南部出張所所長) は, 横浜・東京支所鹿島出張所所長へ
 (15ページへ続く)